

Date of Deposit: September 26, 2003

Docket No. 101483-5

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANTS : Tahei TAHARA
SERIAL NO. : To Be Assigned
FILED : Herewith
FOR : Time-Resolved Fluorescence Microscope
ART UNIT : To Be Assigned
EXAMINER : To Be Assigned

September 25, 2003

Commissioner for Patents
PO Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

SIR:

Appended hereto is a certified copy of Priority Document 2003-089026 filed March 27, 2003.

Applicant requests that this document be made of record in the above identified application.

Respectfully submitted,
NORRIS, OLAUASHLIN & MARCUS, P.A.
By _____
Bruce S. Londa
Reg. No. 33,531

220 East 42nd Street - 30th Floor
New York, New York 10017
Tel.: (212) 808-0700
Fax: (212) 808-0844

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that the foregoing Transmittal of Priority Document is being deposited with the United States Postal Service as Express Mail Label No. EV 328767365 US in an envelope addressed to: Mail Stop Patent Application, Commissioner for Patents, PO Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date indicated below:

Date: September 26, 2003

By Julie Harting

Julie Harting

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 3月27日
Date of Application:

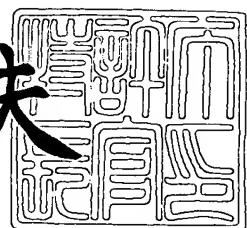
出願番号 特願2003-089026
Application Number:
[ST. 10/C] : [JP2003-089026]

出願人 理化学研究所
Applicant(s):

2003年 8月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3069530

【書類名】 特許願
【整理番号】 RJH14-257
【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願
【提出日】 平成15年 3月27日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 21/64
【発明の名称】 時間分解蛍光顕微鏡
【請求項の数】 5
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
【氏名】 田原 太平
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
【氏名】 藤野 竜也
【特許出願人】
【識別番号】 000006792
【氏名又は名称】 理化学研究所
【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔
【選任した代理人】
【識別番号】 100102576
【弁理士】
【氏名又は名称】 渡辺 敏章

【選任した代理人】

【識別番号】 100105463

【弁理士】

【氏名又は名称】 関谷 三男

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 時間分解蛍光顕微鏡

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ピンホールと、

試料を載置する試料ステージと、

前記ピンホールの像を前記試料ステージ上の試料に縮小投影するとともに試料から発生された蛍光を前記ピンホールに結像する対物レンズ系と、

パルスレーザ発生手段と、

前記パルスレーザ光発生手段から出射されたレーザ光を2分割する光分割手段と、

前記光分割手段によって分割された一方のレーザ光を試料励起光として前記ピンホールに入射させる手段と、

前記光分割手段によって分割された他方のレーザ光の光路長を可変する光路長可変手段と、

前記ピンホールから出射した試料からの蛍光と前記光路長可変手段を通ったレーザ光とを混合して両者の和周波光を発生させる非線形光学素子と、

前記非線形光学素子から発生された和周波光を分光する分光手段と、

前記分光手段からの出射光を検出する検出器と、

前記光路長可変手段によって前記他方のレーザ光の光路長を変化させたとき前記検出器から得られる出力を記録する記録手段と

を含むことを特徴とする時間分解蛍光顕微鏡。

【請求項 2】 請求項1記載の時間分解蛍光顕微鏡において、前記光分割手段と前記ピンホールの間の試料励起光光路中にプリズム対を配置し、励起光に予め負の分散を与えることを特徴とする時間分解蛍光顕微鏡。

【請求項 3】 請求項2記載の時間分解蛍光顕微鏡において、前記試料励起光の光路中に配置された1/2波長板と、前記1/2波長板の角度と前記光路長可変手段とを連動させて制御する制御部を更に備えることを特徴とする時間分解蛍光顕微鏡。

【請求項 4】 請求項2記載の時間分解蛍光顕微鏡において、前記非線形光

光学素子と前記分光手段の間に前記非線形光学素子を通った光を平行にするコリメート用レンズと、アイリスと、集光用レンズとを配置し、前記非線形光学素子から発生された和周波光を分離して前記分光手段に入射させることを特徴とする時間分解蛍光顕微鏡。

【請求項 5】 請求項4記載の時間分解蛍光顕微鏡において、前記ピンホールと前記対物レンズ系の間に光路を折り曲げる光学素子として全反射ミラーを配置したことを特徴とする時間分解蛍光顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微小領域からの蛍光をフェムト秒オーダーで時間分解測定できる時間分解蛍光顕微鏡に関する。

【0002】

【従来の技術】

時間分解蛍光分光法と光学顕微鏡を組み合わせた時間分解蛍光顕微鏡は、微小領域における分子の電子状態に関する情報を、他の要因に妨害されず、正確に与えてくれる優れた装置である。これまでの時間分解蛍光顕微鏡に用いられる時間分解の手法は、大きく分けて時間相関单一光子計測法とストリーケカメラ法の二種類に分類できる。

【0003】

図2は、時間相関单一光子計測装置の例を示す図である（非特許文献1参照）。レーザダイオード51から発せられたパルス光は、フィルタ52を通り、顕微鏡対物レンズ（油浸レンズ）53によって集光され、励起光として試料54の微小領域に照射される。試料の励起光照射位置は、CCDカメラ55で撮像された試料の拡大画像をモニタ56で観察しながら試料を微動することによって調整することができる。励起光照射によって試料から発生された蛍光は、フィルタ57、58によって波長選択された後、ピンホール59を介してフォトダイオード60で検出される。一方、レーザダイオード発光用の電気信号をトリガーとして、フォトダイオード60で受けた試料からの蛍光によって生じた電気パルスを時間

波高変換器（TAC）61に入力する。TAC61はトリガー信号とフォトマルからの信号の時間差に応じた電気パルスを出力する。これをマルチチャンネルアナライザ（MCA）62に通して時間差と頻度の分布をとると、顕微鏡下に存在する試料による蛍光の時間減衰に相当する波形が得られる。

【0004】

ストリークカメラ法は、レーザからの電気信号をトリガーとして、顕微鏡下にある試料からの蛍光を分光器を通した後ストリーク管に導入する。入射した光は光電面にあたり、光から電子に変換される。発生した電子は加速された後、ストリーク管の上下に印加された電圧によって飛ぶ方向が変えられる。この印加電圧を高速に変化させることにより、蛍光の時間分布を空間変化として捕らえることができる（非特許文献2参照）。

【0005】

また、バルク試料から発生された蛍光を時間分解測定する方法として、レーザから発せられたパルス光を2分し、その一方を試料励起光として、試料から発せられた蛍光と他方のパルス光（ゲートパルス）とを非線形光学結晶中で混合し、非線形光学結晶から発生される両者の和周波数の光を検出する和周波発生法（アップコンバージョン法）が知られている（非特許文献3参照）。この方法によると、ゲートパルスの遅延時間を変化させて測定を反復することにより、蛍光を時間分解測定することができる。

【0006】

【非特許文献1】

Review of scientific instruments, vol.70, p1835-1841, 1999

【非特許文献2】

Applied Physics Letters, vol.80, no.18, p3340-3342, 2002

【非特許文献3】

Journal of Physical Chemistry A, vol.101, p3052-3060, 1997

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

一般に物体の各種の動的挙動（化学反応、エネルギー移動等）の解明にはサブ

ピコ秒（ 10^{-12} 秒以下）から数百フェムト秒（ 10^{-13} 秒）の時間分解能が必要である。しかしながら、これまで使用されている時間分解蛍光顕微鏡では、時間分解測定において単一光子計測装置やストリーケカメラといった蛍光を電気的に処理する手法を用いるため、ナノ秒（ 10^{-9} 秒）から数十ピコ秒（ 10^{-11} 秒）といった不十分な時間分解能しか得られていなかった。実際、時間相関単一光子計測法を用いた装置では時間分解能は40 p s程度が限界である。また、ストリーケ管を用いた時間分解蛍光顕微鏡の時間分解能は最高でも5 p s程度である。なお、ストリーケカメラ法は、分光器を用いないで時間分解する方法も可能であり、その場合、300フェムト秒程度の高い時間分解能が得られるが、蛍光波長の判別はできない。アップコンバージョン法は、高い時間分解能で蛍光を測定することが可能であるが、微小領域の測定について配慮されておらず、そのままで顕微鏡的な空間分解能を期待することはできない。

【0008】

また光学顕微鏡の一種である共焦点顕微鏡は、顕微鏡に設置したピンホール径を極限まで小さくすることにより、物体の深さ方向の情報を選んで測定できる装置であるが、実際の測定に際しては十分な強度の信号を得るためにピンホールの径をある程度大きくとることが必要であり、そのため深さ方向の空間分解能には限界があった。このように、微小領域における分子の化学反応の解明に最も期待される時間分解蛍光顕微分光の時間分解能は、現在でも十分満足できるものにはなっていない。

【0009】

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑み、光学顕微鏡を用いてサブ・マイクロメートルの微小領域からの蛍光をフェムト秒の時間分解能で時間分解測定できる、高い空間分解能と高い時間分解能を有する時間分解蛍光顕微鏡を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明では、時間分解蛍光顕微鏡における時間分解能と深さ方向の空間分解能を同時に改善するために和周波発生法（アップコンバージョン法）を適用し、時

間分解能を従来法の100倍程度（～600フェムト秒）まで改善し、また深さ方向の空間分解能を通常の共焦点顕微鏡の約2倍程度改善した。

【0011】

従来法は、单一光子計測装置（TAC）やストリークカメラ等の電気的手段を用いて時間分解測定を行うため、その電気的手段の性能できる時間分解能が限界であり、このためフェムト秒領域での蛍光変化をモニタするには時間分解能が十分ではなかった。本発明ではアップコンバージョンとよばれる非線形光学効果を用いた光学的な時間分解の手法を採用することにより、フェムト秒の時間分解能（～600 fs）を実現した。

【0012】

本発明による時間分解蛍光顕微鏡は、ピンホールと、試料を載置する試料ステージと、ピンホールの像を試料ステージ上の試料に縮小投影するとともに試料から発生された蛍光をピンホールに結像する対物レンズ系と、パルスレーザ発生手段と、パルスレーザ光発生手段から出射されたレーザ光を2分割する光分割手段と、光分割手段によって分割された一方のレーザ光を試料励起光として前記ピンホールに入射させる手段と、光分割手段によって分割された他方のレーザ光の光路長を可変する光路長可変手段と、前記ピンホールから出射した試料からの蛍光と光路長可変手段を通ったレーザ光とを混合して両者の和周波光を発生させる非線形光学素子と、非線形光学素子から発生された和周波光を分光する分光手段と、分光手段からの出射光を検出する検出器と、光路長可変手段によって前記他のレーザ光の光路長を変化させたとき前記検出器から得られる出力を記録する記録手段とを含むことを特徴とする。

【0013】

光分割手段とピンホールの間の試料励起光光路中にプリズム対を配置し、励起光に予め負の分散を与えることが好ましい。励起光に予め負の分散を与えることによりサンプル位置で最も時間幅が短いパルスでサンプルを励起することができる。プリズムを対で用いることにより、人工的に異常分散回路（負の群速度分散）を作ることができる。通常フェムト秒のパルス光がレンズやミラーなどの媒体を通過すると、パルスを構成する光の波長の違いにより（フェムト秒パルスでは

、10 nm程度のスペクトル幅を持つ) 媒質中での屈折率が違うので、各波長により媒質を通過する速度が変化し、結果としてレーザパルスの時間幅が延びることになる(長波長成分が短波長成分に比べ、速く進む)。プリズム対をパルスが通過することにより、長波長成分を遅らせ、短波長成分を進めることができ、結果としてパルス時間幅が圧縮される。本装置のプリズム対では、顕微鏡の対物レンズ等を通過することによって生じてしまう正の分散(パルスの時間的広がり)を予め打ち消すように負の分散を与えており、サンプル部を理想的には分散ゼロの光(最短パルス)で励起することが可能となる。

【0014】

試料励起光の光路中に1/2波長板を配置し、その1/2波長板の角度と光路長可変手段とを連動させて制御する制御部を更に備えてもよい。この構成によると、励起光の偏向方向を自動制御しつつ蛍光の測定を行うことができ、自動で偏光異方性の測定が可能である。

【0015】

また、非線形光学素子と分光手段の間に非線形光学素子を通った光を平行にするコリメート用レンズと、アイリスと、集光用レンズとを配置し、非線形光学素子から発生された和周波光を分離して分光手段に入射させるように構成するのが望ましい。また、ピンホールと対物レンズ系の間配置する光路を折り曲げる光学素子は、全反射ミラーとするのが好ましい。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

図1は、本発明によるフェムト秒時間分解蛍光顕微鏡の模式図である。

Nd:YVO₄レーザ11により励起されたチタンサファイアレーザ12の基本波(中心波長800 nm, 光出力750 mW, パルス繰り返し周波数82 MHz, パルス時間幅75 fs)を非線形光学素子13に集光し、発生した第二次高調波(400 nm, 50 mW)を試料励起用の光源として用いる。発生された励起光(400 nm)は波長選択ミラー14aで反射され、分散補償用プリズム対15により予め負の群速度分散を与えられた後、1/2波長板16a、集光用レ